

⑫特許公報(B2)

昭57-54742

⑬Int.Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑭⑮公告 昭和57年(1982)11月19日
G 01 N 27/46 7363-2G
C 12 Q 1/00 6543-4B 発明の数 1
//G 01 N 27/30 7363-2G
33/18 6514-2G (全8頁)

1

2

⑯BODの測定法

⑰特 願 昭52-113625
⑱出 願 昭52(1977)9月21日
⑲公 開 昭54-47699
⑳昭54(1979)4月14日
㉑発 明 者 鈴木周一
東京都豊島区巣鴨1-40-6
㉒発 明 者 軽部征夫
立川市富士見町4-11-8
㉓発 明 者 引馬基彦
横浜市瀬谷区三ツ境158-26
㉔発 明 者 鈴木浩
川崎市幸区鹿島田958
㉕出 願 人 味の素株式会社
東京都中央区京橋1丁目5番8号
㉖出 願 人 鈴木周一
東京都豊島区巣鴨1-40-6
(公害防止関連技術)

㉗特許請求の範囲

1 酸素電極の隔膜とそれを覆う透析膜の間に有機物を酸化し酸素を消費する微生物を封入してなる微生物電極を被検液に接触せしめ、BODと比例関係にある電流値を測定することを特徴とする微生物電極によるBODの測定法。

2 当該微生物電極をリン酸イオン共存下で被検液に接触せしめ当該電流値を測定することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のBODの測定法。

発明の詳細な説明

本発明は生物化学的酸素要求量(以下BODと略す)をきわめて迅速に測定する方法およびその装置に関する。

現在、BODの測定は日本工業規格に定められている方法(工業排水試験方法JISK0102-1972)に従って行われているが、これは測定

に長時間を要し操作も煩雑であるため以前から簡便で短時間で測定できる改良法が切望されていた。本発明者等はこの目的にかなうものとして微生物酸素電極を用いて20~30分の短時間で迅速に測定する方法をすでに開発した(昭和51年度日本発酵工学会大会講演要旨集P-127、特願昭51-121942号)。

この方法は、土壌微生物をコラーゲン等で包括固定化して得られる固定化微生物膜と酸素電極を組合せた微生物電極を被検液に入れて所定時間(20~30分)経過後に平衡電流値を測定するという極めて簡単に迅速な測定法である。

この方法は、BODを30分間以内の短時間で測定することが可能であり、BOD測定値の範囲が広く、測定値の再現性、精度が高く、しかも長時間くり返し使用でき自動化も可能である等従来法に比べて多くの利点を有する優れたBOD測定法である。

しかしながら、本発明者等はこの固定化微生物電極法の改良および実用化を目的としてさらに研究を行ったところ、この固定化微生物電極は長時間連続的に使用するとBOD値一定の被検液から得られる平衡電流またはBOD値ゼロの被検液に対する平衡電流値(ベースライン)が漸次減少して測定不能となり、随時、固定化微生物膜の交換が必要であり、長時間連続的に使用する場合大きな支障となることが判明した。又、BOD測定の際被検液のリン酸根(PO_4^{3-} など)の存否により測定誤差が生じ、これも一つの問題点であった。

本発明者等はこれらの欠点を改善し、さらに短時間で測定することを目的として鋭意研究を重ねた結果、固定化微生物膜電極の代りに、酸素電極の隔膜とそれを覆う透析膜の間に微生物を封入した微生物電極を用いることにより、又、さらにBOD測定時にリン酸イオンを共存せしめて測定することによりこれらの問題を解決することができた。

3

本発明は酸素電極の隔膜とそれを覆う透析膜の間に有機物を質化し、酸素を消費する微生物を封入した微生物電極を被検排水に接触せしめ、被検液のBODと比例関係が成り立つ電流値を測定し、この電流値からBODを算出することからなるBODの測定法およびその装置である。

本発明に於て使用する微生物は有機物を質化し酸素を消費する微生物が使用され、シュードモナス・フルオレッツセンス、バチルス・ズブチリス、シュードモナス・エルギノサなどの細菌、アスペルギルス・ニガー、リゾプス・ホルモセンシスなどの糸状菌およびストレプトミセス・グリセウスなどの放線菌などが使用される。これらは一例にすぎないが一般には土壌や活性汚泥から得られる微生物群が用いられる。

これら微生物は栄養培地で培養し、生育力の強い対数増殖期で集菌したものを用いれば良く、洗浄後生理食塩水に懸濁し、低温下に保存しておけば長期間使用できる。

第1図は本発明の微生物電極の一例を示すものである。第1図の1は透析膜、2は封入微生物、3はテフロン（登録商標名）膜（酸素電極隔膜）、4は白金カソード、5はアルミニウムアノード、6は塩化カリウムの電解液を示している。

酸素電極は一般に用いられているものを使用すれば良く、この酸素電極の隔膜を被覆する透析膜は封入した微生物が通過できないものであれば良く特殊なものは必要でなく排水中の物質が自由に出入できる程度の微細孔を有するものであれば何でも使用できるが、一般にはセロファン膜やアセチルセルロース膜で十分である。

前記微生物を封入する方法としては、微生物を隔膜上に直接塗布し、これを透析膜で覆う直接被覆法や濾紙片などの担体に微生物を付着させたものを、隔膜に密着させて封入する方法がある。後者は微生物量のコントロールが容易であり、特性の一定した微生物電極が得られるので本発明の実施には特に望ましい。

また、2枚の透析膜の間に微生物を封入したものを低温下に保存しておき、使用時にこれを酸素電極の隔膜に密着させて使用方法も便利である。

封入する微生物の量は、透析膜内に拡散してくる排水中の有機物をすみやかに質化するのに十分な

4

量を封入することが望ましい。即ち、有機物の拡散がその質化過程での律速となるに十分な微生物量を封入することが望ましい。

第2図は本発明の微生物電極を用いたBOD測定システムの一例を示すものである。第2図中1は微生物電極、2は酸素電極の負荷抵抗器、3は記録計、4はサンプル、5は回転子を示す。

以下に本発明のBOD測定法の原理を説明する。

酸素飽和状態の供試排水に微生物電極を入れると、排水中の有機物が封入した微生物によつて質化され、酸素電極近傍の酸素濃度が減少し電流値は次第に低下し、10～20分後にある一定値（平衡電流値）に達する。これは排水から透析膜内への酸素の拡散量と封入微生物によつて消費される酸素量との間に平衡関係が成立するために一定の電流値が得られるものと推定される。この微生物によつて消費される酸素量は排水中のBOD成分（有機物）の濃度に依存する。換言すれば電流値と排水中のBODの間には比例関係が成立する。従つてこの電流値とBODの関係をあらかじめ標準液により求めておくことにより電流値から試料中のBODを知ることができる。

BOD測定は、温度20～35℃、pH 5.5～8.0の条件で行われ、測定中は試料を回転子等で十分攪拌する必要がある。この際リン酸イオンを $10^{-1}M \sim 10^{-3}M$ 共存下で測定することが望ましく、リン酸イオン共存下で測定することにより測定時間がさらに短縮され10～15分間で測定でき、同時に感度も増大する。排水中にリン酸イオンが含有されているものと含有されていないものでは従来法ではかなりの差が見られたが、リン酸イオンの常に共存した状態で測定することによりこの問題は解決できた。

本発明の微生物電極の代りに、従来の固定化微生物膜を用いた場合にも原理は同一であり同一の結果が得られる。しかしながら、従来法では連続的に測定するとベースラインが漸次上昇し24～48時間以上の使用は不可能である。この原因は詳らかではないが、微生物がコラーゲン等で包括固定化されているため、微生物が排水中の有機物を質化増殖するに従つて固定化担体中の微生物の環境が変化するためと考えられる。例えばコラーゲンで固定化した場合には微生物もしくはその生産物によるコラーゲンの加水分解が行われ固定化

5

膜自体の物理・化学的变化が生じてベースラインに影響が現われるものと思われる。

これに対し本発明の微生物電極では微生物は単に封入されているだけであり排水中の栄養物を資化し、環境に適した種が優先的に増殖を行うもので、その生活環境の変化は小さくほぼ自然状態に保されているため安定しているものと思われる。

本発明で使用する微生物懸濁液は低温で保存すれば数ヶ月間保存でき、保存性に関しても固定化微生物膜に劣らず長時間安定に保存される。

本発明の微生物電極によるBOD測定法は、被検液中のBOD値を15分以内という極めて短時間に測定でき、少くとも240時間は連続的に使用でき、しかも塩類の影響を受けず再現性、精度も優れている。又本発明の微生物電極を製作するために、煩雑な微生物の固定化操作を必要とせず極めて簡単に製作できるなど多くの利点を有する優れたものである。

以下実施例にて詳細に説明する。

実施例 1

食品工場の活性汚泥処理設備の返送汚泥40mlをグルコース1%、ポリペプトン1%、酵母エキス1%、食塩0.5%の培地500mlに接種し、30℃で10時間通気培養した後、遠心分離して得た湿菌体を酸素電極のテフロン膜上に塗布した後それをセロファン膜で覆い上部を輪ゴムで固定し、第1図に示すような微生物電極を作製した。

このようにして製作した微生物電極を第2図のような測定装置に取付け温度30℃に保ち、被検液として酸素飽和させたpH 7.0 0.05mol/lのリン酸バッファ液と接触させた(以下このようなBOD値ゼロの被検液をゼロ液と呼ぶ。またすべての被検液は酸素飽和させる)。

つぎに、標準被検液として日本工業規格で定められているグルコース・グルタミン酸標準液(グルコースとグルタミン酸の等量混合液)を0.05mol/l pH=7のリン酸バッファ液でBOD値9ppmに希釈したのちに、上記と同じ方法によって固定化微生物電極を接触させて出力電流値の時間的変化を記録させ、平衡電流値を読取った。

同様な方法でBOD値18ppm、36ppmにそれぞれ希釈した標準被検液についても測定して第3図に示す結果を得た。

第3図で、Bは9ppm、Dは18ppm、Fは

6

27ppm、Hは36ppmの標準被検液の平衡電流値をそれぞれ示し、A、C、E、G、Iはゼロ液の平衡電流値(以下ベースラインと呼ぶ)を示す。さらに同図からそれぞれの被検液BOD値に対する平衡電流値をプロットすると第4図のようになった。

第3図、第4図をみると、本固定化微生物電極はBOD値9ppmから36ppmの間の被検液に対して15分間以内に平衡電流を示し、かつ、被検液BOD値と平衡電流値が比例関係にあることがわかる。

すなわち広い範囲のBOD値の被検液が短時間で測定しうることが明らかである。

実施例 2

本法による固定化微生物電極の長期的な安定性を調べる目的で、実施例1と同様な方法で連続的に240時間本微生物電極を作動させた。

そのときのベースラインとBOD値36ppmのグルコース・グルタミン酸標準液に対する平衡電流値の時間的推移をそれぞれプロットして第5図に示した。第5図でAではベースラインを又BはBOD36ppmの標準液の平衡電流値を示す。同図で長時間の間には平衡電流値の若干のドリフトが認められるが、実用上は随時、標準液でチェックすることにより補正可能である。したがって、本固定化微生物電極は実用上から必要とされる安定性、耐久性を有することがわかる。

実施例 3

実施例1と同様な方法で得た湿菌体4gを1%コラーゲン・フィブリル懸濁液(pH=4.0)100gと混合し、テフロン板上にキャストイングして20℃で乾燥したのち、20℃の1%グルタルアルデヒド溶液に1分間浸漬してなめした。

このようにして得た固定化微生物膜を適当な大きさ(5cm×5cm)に切断し酸素電極のテフロン膜上に輪ゴムで固定した。

このようにして作製した固定化微生物電極を実施例2と同様な方法によつて連続的に作動させ、安定性、耐久性を調べた。このときのベースラインの時間的推移を第6図に示した。この図からわかるように、この固定化微生物電極は55時間の連続作動でベースラインがゼロの電流値を示し、測定不能となつた。

実施例 4

7

被検液中に含まれる塩類の影響を調べるため種々の塩類について試験を行つたところ、リン酸イオン (PO_4^{3-}) が極めて大きい影響を与えることが判つた。

すなわち、実施例1と同様な方法で作製した固定化微生物電極にゼロ液 (BOD値ゼロの被検液) でリン酸イオンを含まないものと24時間接触させて平衡電流値 (ベースライン) を測定した。

この様子を第7図Aに示した。

つぎにBOD値18ppmのリン酸根を全く含まないグルコース・グルタミン酸標準液と接触させると同図Bに示す平衡電流値が得られた。

ここで一旦ゼロ液に接触させて同図のCの平衡電流値を得たのちに、BOD値13ppmでリン酸イオン0.16mol/l含む標準液と接触させたところ同図のDの如く平衡電流値はゼロ近くまで減少した。

図中のBと比較するとリン酸イオンの影響によつて平衡電流値は大きく減少していることがわかる。

つづいて、再びリン酸イオンを含まないゼロ液と接触させたところ、同図Eの如くであり、以前の平衡電流値Cまで短時間には回復しなかつた。すなわち、リン酸イオンの影響はそれを含まない液と接触させた後も継続した。

そこでゼロ液としてリン酸イオン0.05mol/l含むものについて同様の試験を行つた。その結果第8図の如くリン酸イオンを含まないBOD値18ppmの標準液、リン酸イオン0.16mol/l含む同じBOD値の標準液およびリン酸イオンを0.016mol/l含む同じBOD値の標準液の平衡電流値はそれぞれB, D, Fのようになり、リン酸イオンの影響は著しく低減された。とくに、リン酸イオン0.016mol/lのものは

8

その影響がほとんど認められなかつた。また、ベースラインはA, C, E, Gの如く安定化した。

つぎにリン酸イオンが0.05mol/l含まれているときと含まれていないときの18ppmの標準液の平衡電流に到達する速さを測定したところ、第9図のそれぞれA, Bの如くの結果を得た。

すなわち、リン酸イオンの含まれている被検液の応答Aの方が含まれていないBの応答よりも10分程度速やかに平衡電流が得られ、測定時間が短縮された。

実施例 5

食品工場の排水をpH=7、0.05mol/lのリン酸バッファ液で適宜に希釈し、実施例1と同様な方法で測定を行つた。

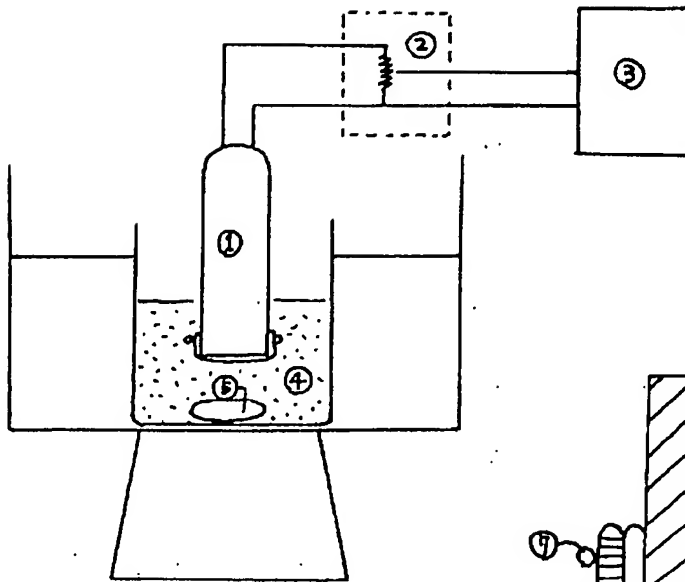
同時に日本工業規格の測定法によつてBOD値を求め、本法による測定値との関係をプロットしたところ、第10図に示すように両者の間に比例関係が成立した。

このことから本法により実際の排水のBOD値が迅速に測定できることがわかつた。

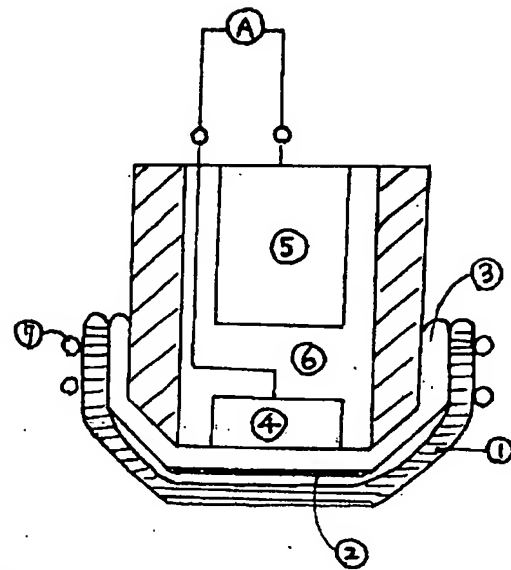
図面の簡単な説明

第1図は本発明のBOD測定装置の一例を示すものである。第2図は本発明のBOD測定システムの一部を示す説明図である。第3図、第4図はBOD濃度と平衡電流の関係を示すグラフである。第5図は本発明装置の安定性、耐久性を示すグラフである。第6図は従来の微生物電極の安定性、耐久性を示すグラフである。第7図は被検液中のリン酸イオンの影響を示すグラフである。第8図はリン酸イオン共存下で測定する時の応答曲線を示す。第9図はリン酸イオンの効果を示すグラフである。第10図は排水のBODと平衡電流の関係を示すグラフである。

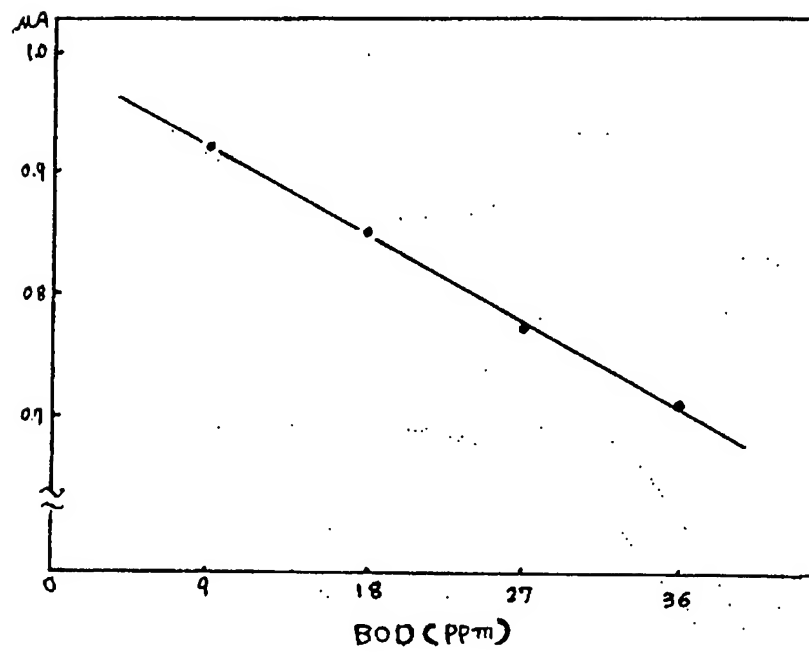
第2図



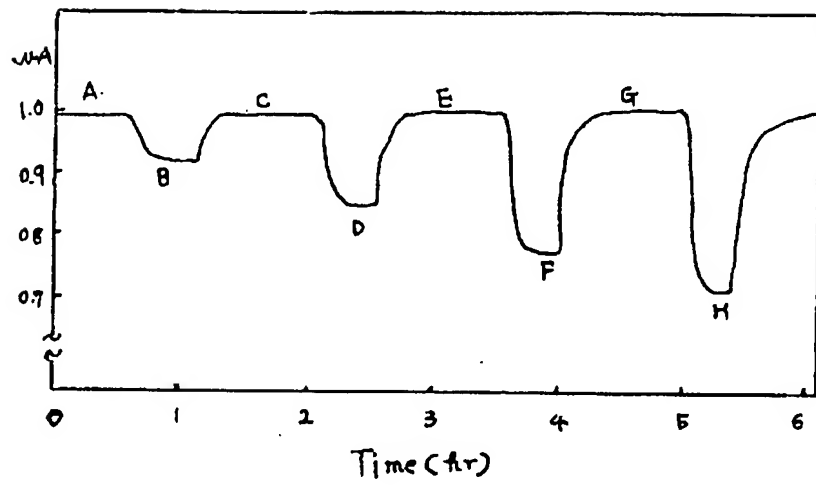
第1図



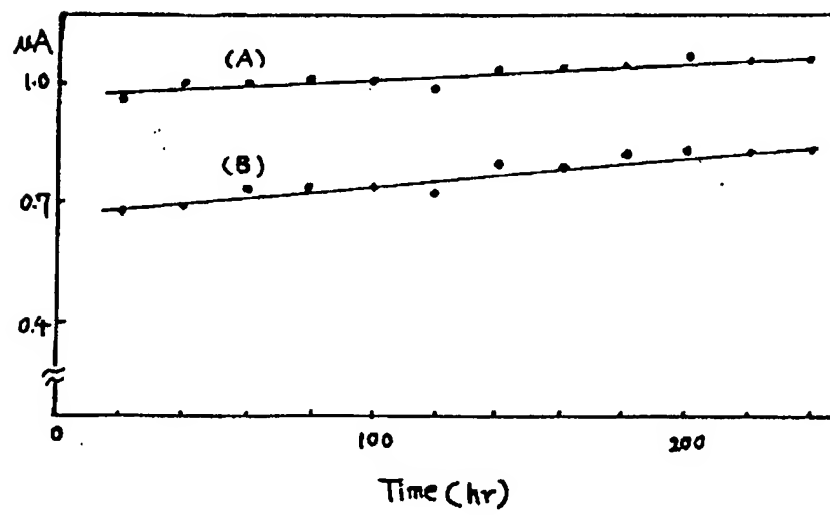
第4図



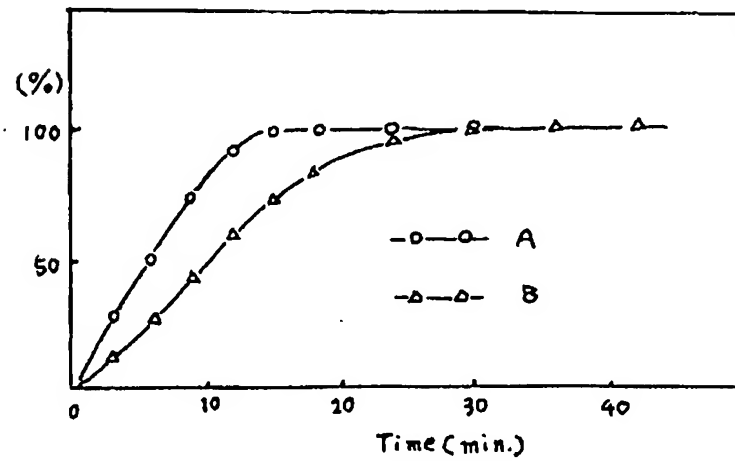
第3図



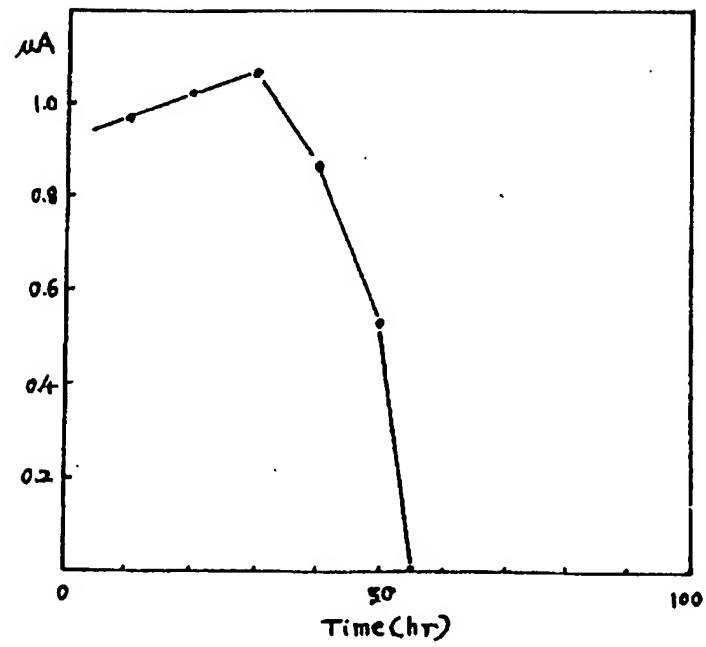
第5図



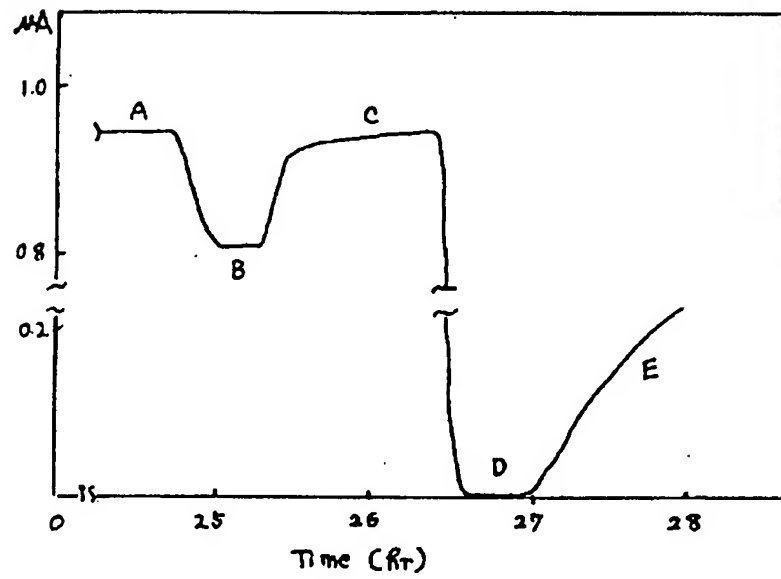
第9図



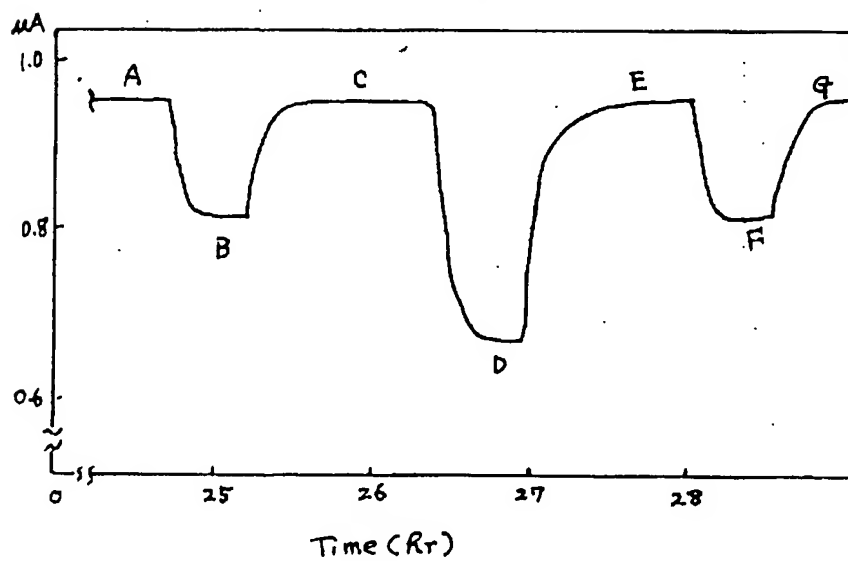
第6図



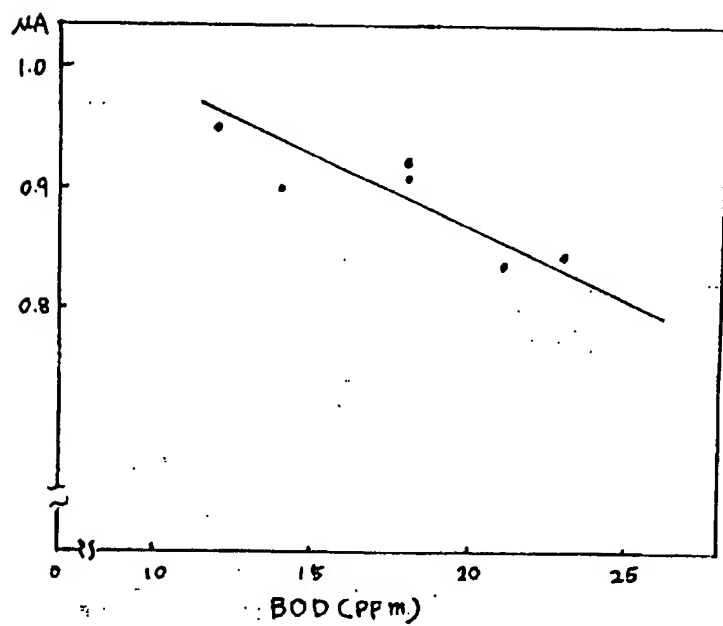
第7図



第8図



第10図



Translation of Japanese Reference

METHOD FOR MEASURING BOD

5 Claims

1. A method for measuring BOD using a microorganism electrode, wherein the method comprises:

contacting the microorganism electrode with a sample solution, and
measuring electric current which is proportional to BOD,

10 wherein the microorganism electrode includes a microorganism that catabolizes organic materials and consumes oxygen in between a separating membrane of an oxygen electrode and a dialysis membrane covering the separating membrane.

2. The method for measuring BOD of claim 1, wherein the electric current is measured by contacting the microorganism electrode with the sample solution in the presence of phosphate
15 ion.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to methods of determining biochemical oxygen demand (BOD) very fast and simply, and to devices used for the methods.

20 Currently, the BOD measurement is carried out according to the method defined by the Japanese Industrial Standard (JIS) (the method for testing industrial wastewater: JISK0102-1972). However, since this method is time-consuming and cumbersome, there has been a need for an improved method that enables the determination of BOD with short time in simple way. To meet this objective, the present inventors already invented a method for rapid determination of
25 BOD, which can be done in time as short as 20-30 min using a microorganism oxygen electrode (Abstract for the 1976 Annual Meeting of the Society of Fermentation Technology, Japan, P-127; Japanese Patent Application No. S51-121942).

This method is a remarkably simple and fast method, in which a microorganism electrode, which is configured by combining an oxygen electrode and a
30 microorganism-immobilized membrane obtained by entrapping and immobilizing soil microorganisms with collagen or such, is immersed in a test solution, and the balanced electric current is measured after a certain time (20-30 min),.

The method is an excellent BOD-measuring method having many advantages over the conventional methods, since the method can determine BOD in a short time of 30 min or less,
35 measure a wide range of BOD levels, obtain highly reproducible and precise data, be reusable for long time, and be automated.

The present inventors further conducted studies for the improvement and practical application of the method using the microorganism-immobilizing electrode. However, they found that when the electrode was used continuously over long time, either the balanced electric current obtained from a sample solution with a constant BOD level or that of solution with BOD of zero (baseline) gradually decreased and became impossible to measure, and thereby the microorganism-immobilized membrane had to be replaced as needed, which became a big problem in its continuous use for long time. Another problem was that measurement errors occur in the BOD measurement due to the presence or absence of phosphate ion (PO_4^{2-} and the like) in sample solutions.

The present inventors continued dedicated studies to improve the above shortcomings and enable the measurement in much shorter time. As a result, they solved the above problems by using, in place of the immobilized-microorganism membrane electrode, a microorganism electrode in which a microorganism is housed between the separating membrane of the oxygen electrode and the dialysis membrane covering it, and further by performing the BOD measurement in the presence of phosphate ion.

Thus, the present invention relates to a method for measuring BOD and a device used therein, the method comprising the steps of contacting a sample wastewater with a microorganism electrode in which a microorganism that catabolizes organic materials and consumes oxygen is enclosed between the separating membrane of the oxygen electrode and the dialysis membrane covering it; measuring the electric current, which shows a linear relationship with the BOD in the sample; and calculating the BOD from the electric current.

The present invention uses microorganisms that catabolize organic materials and consumes oxygen, which include bacteria such as *Pseudomonas fluorescense*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, fungi such as *Aspergillus niger* and *Rhizopus formosensis*, and actinomycetes such as *Streptomyces griseus*. These are merely examples, and generally a group of microorganisms obtained from soil or activated sludge may be used.

These microorganisms may be cultured in nutrition medium and harvested at the exponential growth phase when their viability is high. The microorganisms may be washed and resuspended in physiological saline, and stored at low temperature for long-term use.

Fig. 1 illustrates an example of the microorganism electrode of the present invention. The numbers represent as follows: 1. dialysis membrane; 2. enclosed microorganisms; 3. Teflon (registered trade mark) membrane (the separating membrane of the oxygen electrode); 4. platinum cathode; 5. aluminum anode; and 6. electrolytic solution of potassium chloride.

The oxygen electrode may be any one used in general. The dialysis membrane, which covers the separating membrane of the oxygen electrode, does not have to be special one, but can be any membrane as long as it keeps the enclosed microorganism from leaking and contains

micropores the size of which is enough to let substances in wastewater pass through freely. Generally, cellophane membrane, acetyl cellulose membrane, and the like are sufficient.

5 The above microorganism may be enclosed by the direct covering method, in which a microorganism is directly spread on the separating membrane of the electrode and is covered with the dialysis membrane, or by attaching a microorganism to a carrier such as a piece of filter paper and placing the carrier on the separating membrane of the electrode closely. The latter method is particularly preferred because it can easily control the amount of microorganism and therefore provide microorganism electrodes with constant characteristics.

10 In another useful method, the microorganism is enclosed between two dialysis membranes and stored at low temperature. This is attached closely to the separating membrane of the oxygen electrode before use.

It is preferable that the amount of enclosed microorganism is sufficient for rapidly catabolizing organic materials in wastewater diffusing into the dialysis membrane. That is, it is preferable to enclose a sufficient amount of the microorganism such that the diffusion of organic materials become the rate-limiting step in the catabolic process.

15 Fig. 2 illustrates a system for measuring BOD using the microorganism electrode of the present invention. The numbers represent as follows: 1. microorganism electrode; 2. load resistor of the oxygen electrode; 3. recorder; 4. sample; and 5. stirrer bar.

20 The principle of the BOD-measuring method of the present invention will be explained below.

When the microorganism electrode is immersed in sample wastewater saturated with oxygen, organic materials in the wastewater are catabolized by the enclosed microorganism, thereby the oxygen concentration near the oxygen electrode is decreased, and the electric current decreases gradually, reaching a certain constant level (balanced electric current) after 10-20 min. This is presumably because there is an equilibrium established between the amount of oxygen diffusing into the dialysis membrane from wastewater and that consumed by the microorganism, which gives rise to a constant electric current. The amount of oxygen consumed by the microorganism depends on the concentration of BOD components (organic materials) in wastewater. In other word, there is a proportional relationship between the electric current and BOD in wastewater. Thus, by determining in advance the relationship between the electric current and BOD using standard solutions, BOD of sample solutions can be determined from the electric current.

35 The measurement for determining BOD is carried out at 20-35°C in pH 5.5-8.0. During the measurement, samples must be stirred sufficiently with a stirring bar and the like. The measurement is preferably carried out in the presence of phosphate ion at 10^{-1} - 10^{-3} M. The presence of phosphate ion further shortens the measurement time to 10-15 min, and increases the

sensitivity at the same time. In the conventional methods, there is a significant difference in measured values between wastewaters with and without phosphate ion. This problem is solved by carrying out the measurement under the condition such that phosphate ion is always present.

When the conventional microorganism-immobilized membranes are used in place of the microorganism electrode of the present invention, the principle is the same and the same results can be obtained. However, when the conventional methods are used for continuous measurement, the baseline increases gradually, and thus, it is impossible to use them for 24-48 hr or longer. The reason for this is not clear, but is considered to be because the microorganism is entrapped and immobilized with collagen and the like, and therefore the environment around the microorganism in the immobilizing carrier is altered as the microorganism catabolizes organic materials in wastewater and grows. For example, when the microorganism is immobilized with collagen, the microorganism or its product may hydrolyze the collagen and cause physical and/or chemical changes in the immobilizing membrane itself, and thereby affecting the baseline.

In contrast, microorganisms are simply enclosed in the microorganism electrode of the present invention, where species that catabolize nutrients in wastewater and are suitable for the environment proliferate dominantly. Thus, the living environment of the microorganisms is supposed not to change significantly, maintained almost natural, and therefore stable.

The microorganism suspension used in the present invention can be preserved for several months at low temperature. Thus, the preservation stability of the microorganism suspension is not inferior to the microorganism-immobilized membrane.

The method for determining BOD using the microorganism electrode of the present invention can measure BOD in sample solutions in remarkably short time such as within 15 min, and can be used continuously for at least 240 hours. Furthermore, the method is not affected by the presence of salts, and is excellent in the reproducibility and accuracy. Moreover, the microorganism electrode of the present invention is very easy to make without requiring cumbersome processes of immobilizing microorganisms. Thus, the present invention has many advantages.

The present invention will be described below in detail with examples.

[Example 1]

Forty ml of returned sludge from the activated sludge processing plant in a food factory was inoculated into 500 ml of medium containing 1% glucose, 1% polypeptone, 1% yeast extract, and 0.5% sodium chloride, cultured with aeration at 30°C for 10 hr, and microorganisms were harvested by centrifugation. The harvested wet microorganisms were spread on the Teflon separating membrane of the oxygen electrode, covered with cellophane membrane, and then the upper portion was fixed using rubber bands to make the microorganism electrode as shown in

Fig. 1.

The microorganism electrode was set in a measuring device as shown in Fig. 2, maintained at 30°C, and brought in contact with phosphate buffer (0.05 mol/l, pH 7) saturated with oxygen (Such solution with the BOD level zero is hereinafter referred to as "zero buffer").

5 In addition, all sample solutions were saturated with oxygen).

Next, for the standard sample solution, the glucose-glutamate standard solution (solution containing a mixture of equal amounts of glucose and glutamate) defined by JIS, was diluted with phosphate buffer (0.05 mol/l, pH 7) to the BOD level of 9 ppm. The microorganism-immobilized electrode was contacted with this solution as described above, the
10 change in the output electric current was recorded over time, and the balanced electric current was measured.

Similarly, the standard sample solutions diluted to the BOD levels of 18 and 36 ppm were prepared and the electric current was measured to obtain the results shown in Fig. 3.

In Fig. 3, B, D, F, and H show the balanced electric current for the standard solutions
15 with the BOD level of 9, 18, 27, and 36 ppm, respectively; and A, C, E, G, and I show the balanced electric current for the zero buffer (hereinafter referred to as base line). Furthermore, the balanced electric current values obtained from Fig. 3 were plotted against the BOD levels of the standard solutions to obtain Fig. 4.

As shown in Fig. 3 and Fig. 4, the microorganism-immobilized electrode in the present
20 invention showed the balanced electric current within 15 min in the sample solutions with the BOD levels from 9 to 36 ppm, and there was a proportional relationship between the BOD level of sample solutions and the balanced electric current.

Thus, it is clear that the electrode can measure sample solutions with a wide range of BOD levels in a short time.

25

[Example 2]

To examine the long-term stability of the microorganism-immobilized electrode of the present invention, the electrode was continuously operated for 240 hours in the same manner as described in Example 1.

30 Fig. 5 is a plot showing the time course of the balanced electric current for the glucose-glutamate standard solution with the BOD level of 36 ppm and the baseline. In Fig. 5, A and B indicate the balanced electric current values for the baseline and the solution with the BOD level of 36 ppm, respectively. Although there was a slight drift in the balanced electric current over the long time, practically, such drift can be adjusted by checking with the standard
35 solutions as needed. Thus, the results indicate that the microorganism-immobilized electrode of the present invention has the stability and durability required for its practical use.

[Example 3]

Four gram of wet microorganism obtained as described in Example 1 was mixed with 100 g of 1% collagen fibril suspension (pH 4.0), casted onto a Teflon plate, dried at 20°C, and then immersed in 1% glutaraldehyde for 1 min and tanned.

This microorganism-immobilized membrane thus obtained was cut into appropriate size (5 cm x 5 cm), and fixed onto the Teflon membrane of the oxygen electrode using rubber bands.

The microorganism-immobilized electrode was continuously operated as described in Example 2 to examine the stability and durability. Fig. 6 shows the time course for the baseline. As shown in Fig. 6, the electric current of the baseline measured by this electrode became zero after 55 hours of continuous operation, and the electrode became impossible to measure thereafter.

[Example 4]

To examine the effect of salts in sample solutions, a variety of salts were tested. The results revealed that phosphate ion (PO_4^{2-}) had a significantly large effect.

Specifically, the microorganism-immobilized electrode made as described in Example 1 was contacted with the zero solution (test solution with BOD of zero) containing no phosphate ion for 24 hr and the balanced electric current (baseline) was measured.

The result was shown in Fig. 7A.

Next, the electrode was contacted with the glucose-glutamate standard solution with the BOD level of 18 ppm containing no phosphate ion, and the balanced electric current as shown in Fig. 7B was obtained.

Then, the electrode was put back in contact with the zero solution, obtaining the balanced electric current shown in Fig. 7C. Thereafter, when the electrode was subsequently brought in contact with the standard solution with the BOD level of 13 ppm containing phosphate ion (0.16 mol/l), the balanced electric current was decreased to near zero as shown in Fig. 7D.

Compared with Fig. 7B, the balanced electric current was significantly decreased by the effect of phosphate ion.

When the electrode was put back again in contact with the zero solution containing no phosphate ion, the electric current did not return to the level of the balanced electric current in C in short time as shown in Fig. 7E. Thus, the effect of phosphate ion sustained even after the electrode was brought in contact with a solution containing no phosphate ion.

Therefore, similar experiments were carried out using the zero solution containing 0.05 mol/l phosphate ion. As a result, as shown in Fig. 8, the balanced electric currents for the

standard solutions with the BOD level of 18 ppm containing no phosphate ion, containing 0.16 mol/l of phosphate ion, and containing 0.016 mol/l of phosphate ion, were as shown in B, D, and F, respectively. Therefore, the effect of phosphate ion was greatly diminished. In particular, almost no effect was found in the solution containing 0.016 mol/l of phosphate ion. The base line was stable as shown in A, C, E, and G.

Next, the time required for reaching the balanced electric current was measured for the 18 ppm standard solutions with or without 0.05 mol/l of phosphate ion. The results are shown in Fig. 9A and B, respectively.

The response A in the test solution with phosphate ion reached the balanced electric current about 10 minutes faster than the response B without phosphate ion, and thus, the time required for the measurement was shortened by the presence of phosphate ion.

[Example 5]

Wastewater from a food factory was diluted appropriately with phosphate buffer (0.05 mol/l, pH 7), and the BOD level was determined as described in Example 1.

At the same time, the BOD level of the diluted solutions was determined using the method according to JIS, and the data was plotted against that obtained by the method of the present invention. As shown in Fig. 10, there was a linear relationship between the values determined by the two methods.

Thus, the method of the present invention can rapidly determine the BOD level of actual wastewater.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 illustrates an example of the device for determining BOD of the present invention.

Fig. 2 illustrates an example of the system for determining BOD of the present invention.

Fig. 3 and Fig. 4 are graphs showing the relationship between the BOD level and the balanced electric current.

Fig. 5 is a graph showing the stability and durability of the device of the present invention.

Fig. 6 is a graph showing the stability and durability of the conventional microorganism-immobilized electrode.

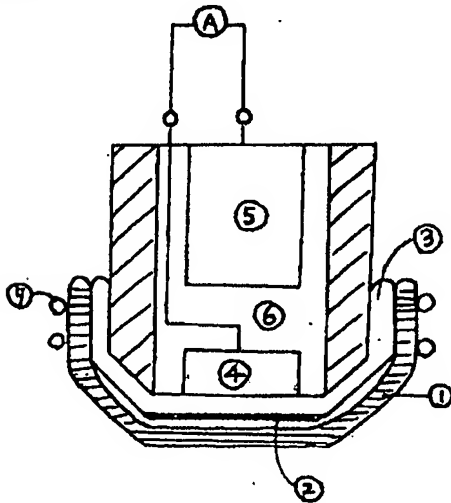
Fig. 7 is a graph showing the effect of phosphate ion in test solutions.

Fig. 8 shows the response curve when the measurement is carried out in the presence of phosphate ion.

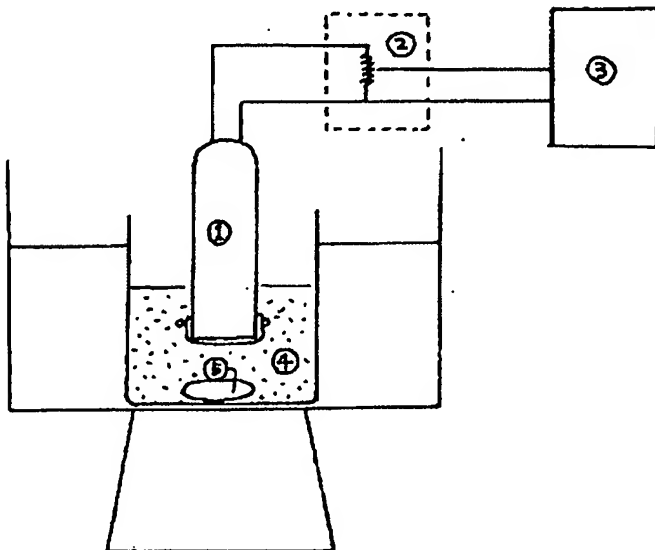
Fig. 9 is a graph showing the effect of phosphate ion.

Fig. 10 is a graph showing the relationship between the BOD of wastewater and balanced electric current.

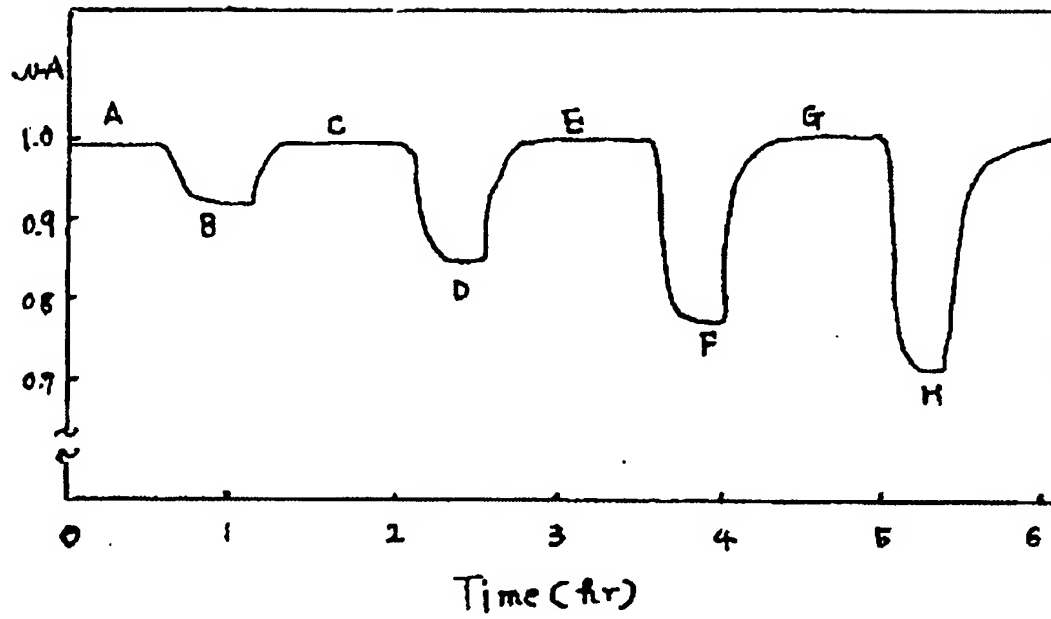
5 [Fig. 1]



[Fig. 2]

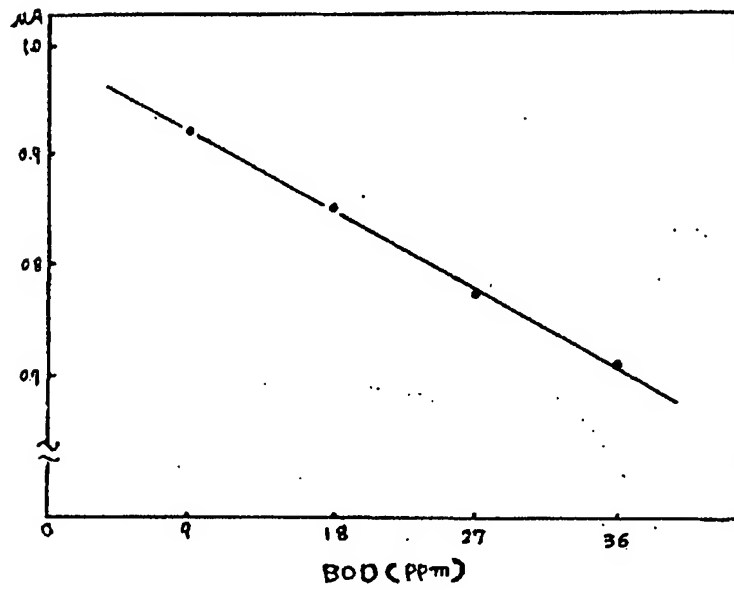


[Fig. 3]

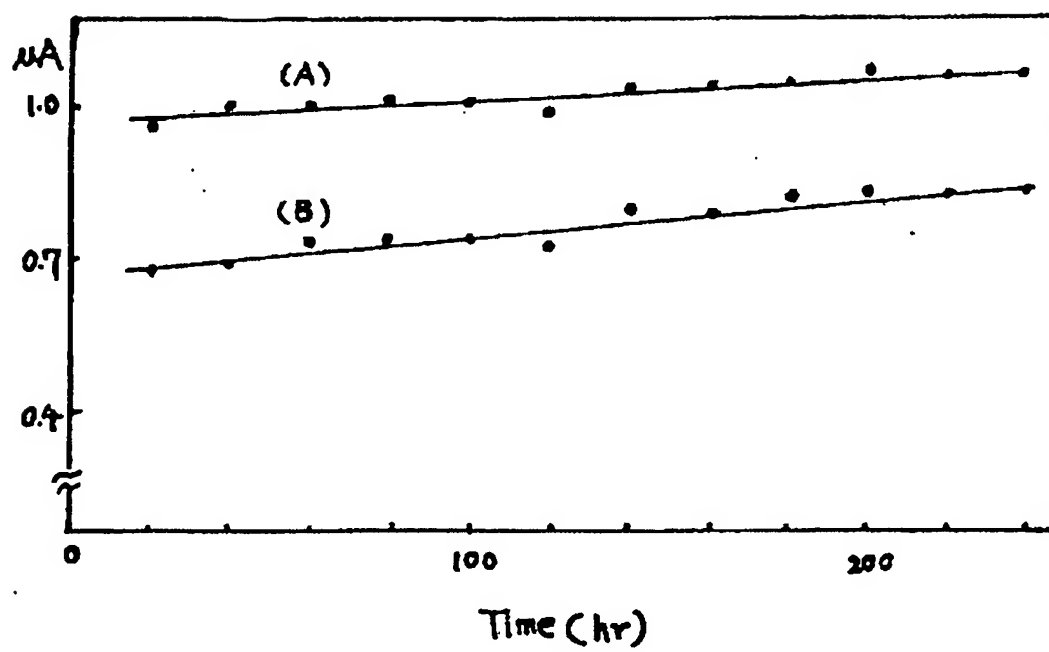


[Fig. 4]

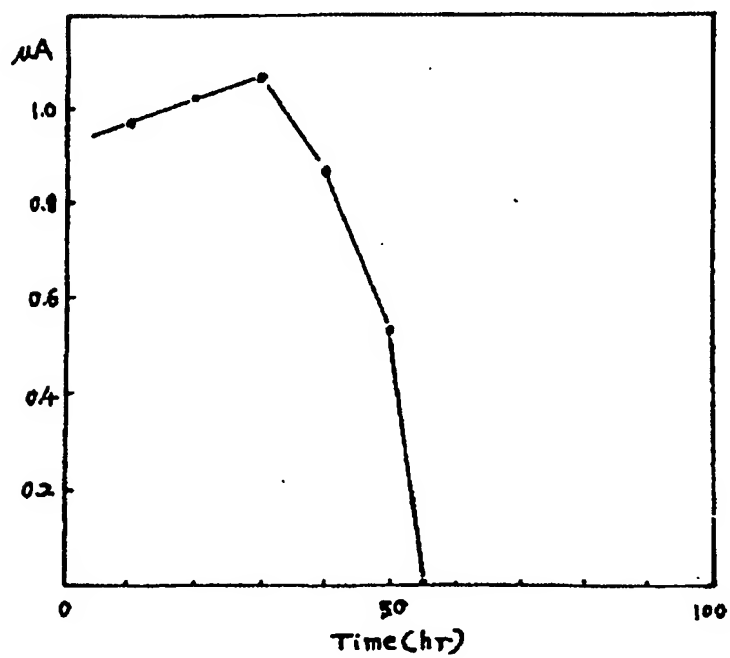
5



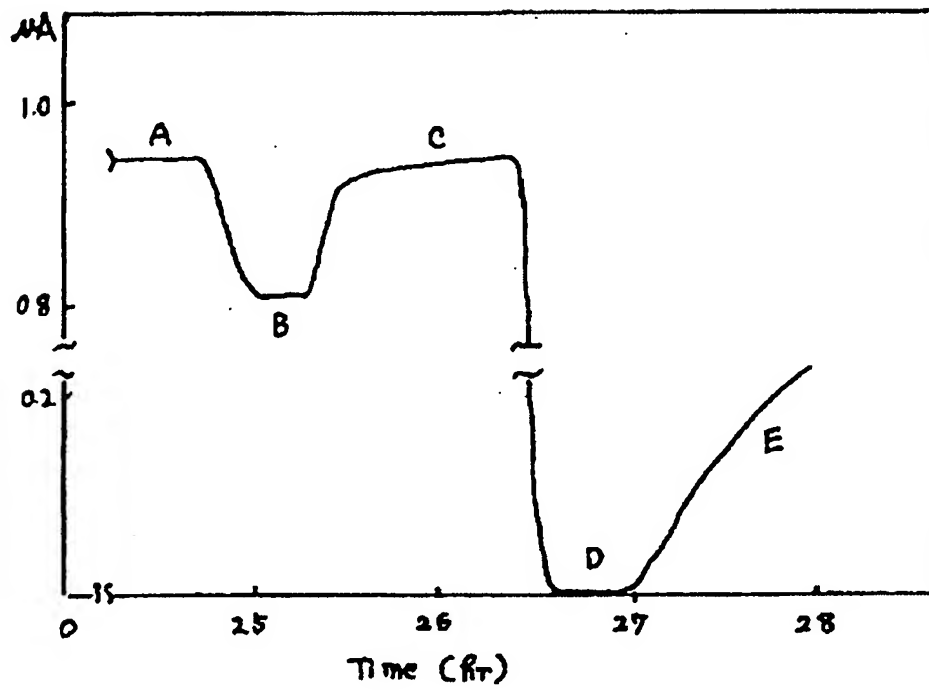
[Fig. 5]



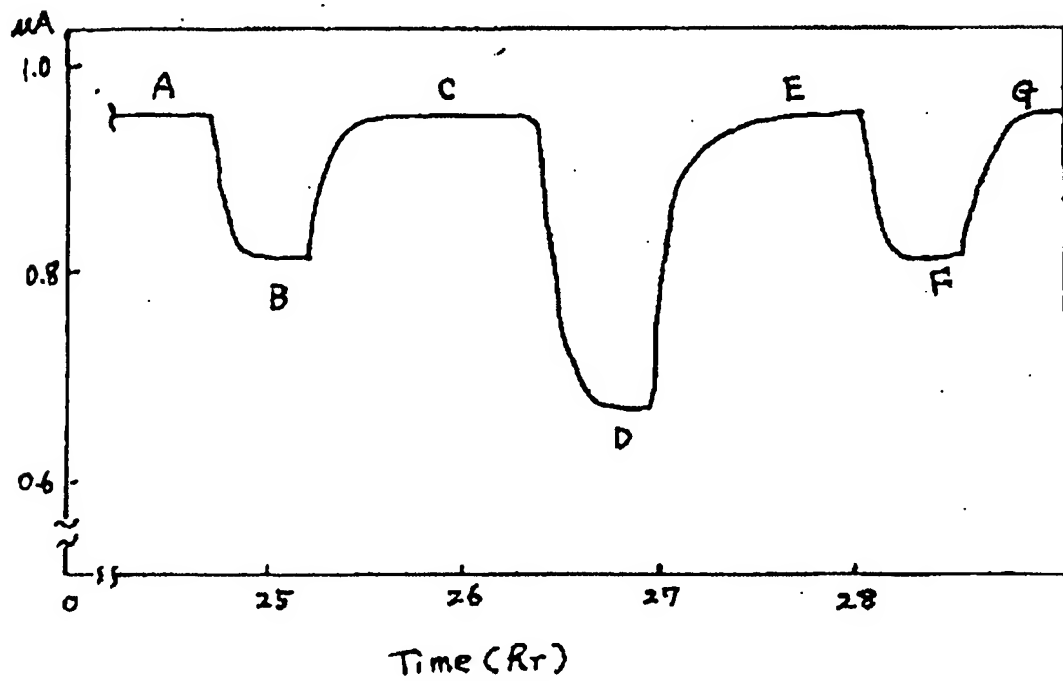
[Fig. 6]



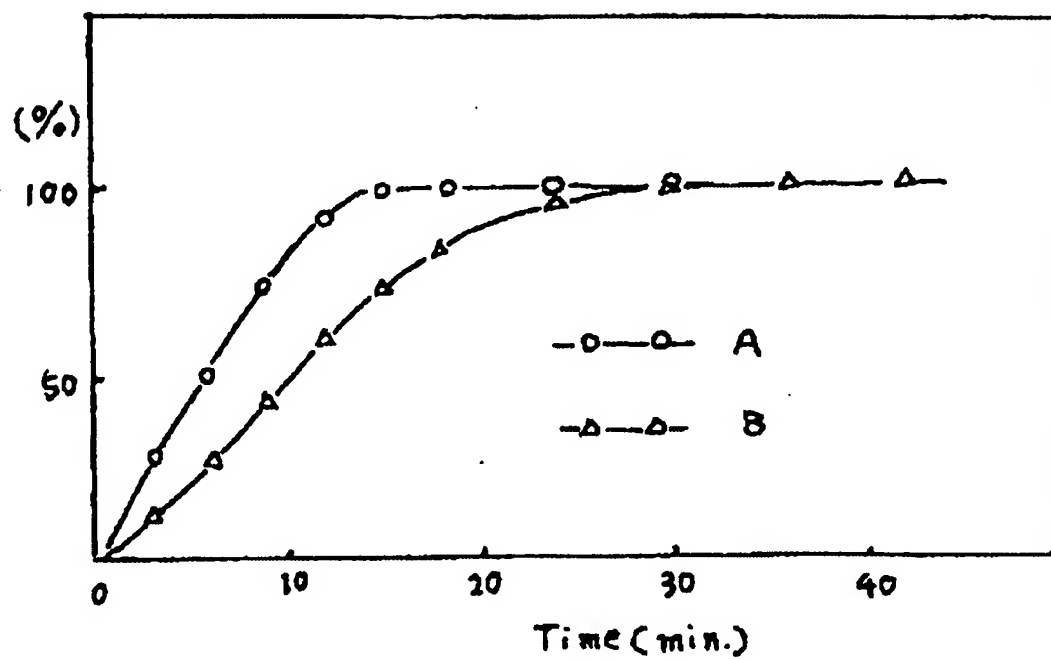
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

